TP02 Méthodes d'études des protéines

Il existe de nombreuses méthodes d'étude des molécules du vivant, aux applications multiples en recherche comme en diagnostic médical.

Nous avons déjà étudié cette année des méthodes de coloration des molécules (par exemple l'eau iodée pour l'amidon). Ce TP s'intéresse à des méthodes de séparation des biomolécules, appliquées ici aux protéines.

- Électrophorèse en conditions natives
- Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS, **β**-mercaptoéthanol)
- Western blot : identifier une protéine sans connaître sa structure

Comment séparer et identifier des protéines au sein d'un mélange complexe, et en déterminer certaines propriétés (masse moléculaire, structure) ?

PLAN

Principe général d'une électrophorèse

I – Électrophorèse en conditions natives

Activité n°1 – Électrophorèse des hémoglobines A et S en conditions natives

II – Électrophorèse en conditions dénaturantes

En pratique

Exercice : Détermination de la taille d'une protéine

Exercice : identification des protéines de la membrane plasmique des hématies

III – Western blot

Exercice d'interprétation des résultats d'un Western Blot

Exercice : Rôle de la protéine p53 dans le devenir des cellules

Conclusion

Principe général d'une électrophorèse

Une électrophorèse consiste à faire migrer des molécules chargées — ici des protéines — sous l'effet d'un champ électrique, à travers un support (gel de polyacrylamide ou bande d'acétate de cellulose) imbibé d'une solution tampon conductrice.
Les molécules chargées négativement migrent vers l'anode (pôle +), tandis que les molécules chargées positivement migrent vers la cathode (pôle −). La vitesse de migration dépend de plusieurs paramètres propres à la molécule, étudiés dans les parties suivantes de ce TP.

I – Électrophorèse en conditions natives

Dans ce premier type d'électrophorèse, les protéines ne sont soumises à aucun traitement préalable : elles conservent leur charge native et leur structure tridimensionnelle au cours de la migration.

Activité n°1 – Électrophorèse des hémoglobines A et S en conditions natives

Matériel	• Gel d'agarose
	• Tubes Eppendorf étiquetés :
	  ○ A : échantillon d'hémoglobine saine + bleu de charge
	  ○ S : échantillon d'hémoglobine d'un individu atteint de drépanocytose + bleu de charge
	  ○ X : échantillon mystère + bleu de charge
	• Cuve à électrophorèse reliée à un générateur
	• Micropipette + cônes

Manipulation	1. Placer le gel dans la cuve, puits vers le haut. 2. Déposer 7 µL de chaque échantillon dans les puits à l'aide de la micropipette. 3. Fermer la cuve et faire migrer environ 45 min. ⚠ Point de vigilance : bien s'entrainer à manipuler la micropipette pour ne pas faire n'importe quoi !
Production	– Schéma légendé du dispositif et des résultats obtenus (position des bandes après migration et coloration). – Interpréter les résultats obtenus et formuler des hypothèses sur les causes des différences de migration. – (Optionnel) Envoyer par mail un montage photo juxtaposant votre schéma et votre observation.

Protocole adapté de : Électrophorèse des hémoglobines A et S sur bande d'acétate de cellulose, D. Pol, Planet-Vie (ENS)
Avec les conseils techniques de V. Mayne.

II – Électrophorèse en conditions dénaturantes

Ce type d'électrophorèse est très couramment utilisé. Comme son nom l'indique, dans cette variante, les protéines sont soumises à un **traitement dénaturant préalable** à leur séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native de la protéine.

Il existe différentes méthodes pour dénaturer les molécules. Les plus classiques sont (i) les traitements thermiques, (ii) les hautes forces ioniques qui vont perturber les liaisons faibles qui participent au repliement des molécules (liaisons hydrogènes, liaisons électrostatiques), et (iii) l'utilisation d'agents dénaturants comme l'urée ou le SDS (sodium dodécyl sulfate).

Ce dernier est un détergent très utilisé pour l'électrophorèse de protéines. Il se fixe sur les protéines avec une densité linéaire approximativement constante, c'est-à-dire que le nombre de molécules de SDS qui se fixe sur une protéine est approximativement proportionnel au nombre d'acides aminés qui la composent, donc à sa masse moléculaire. Toutes les protéines vont donc adopter la même forme linéarisée avec une charge **négative** proportionnelle à la masse moléculaire. Un gel d'électrophorèse réalisé après un traitement au SDS s'appelle un SDS-PAGE (PAGE = PolyAcrylamid Gel Electrophoresis).

Note : le SDS porte une charge négative par son groupement sulfate, ainsi qu'une longue chaîne hydrogénocarbonée hydrophobe lui permettant d'interagir avec de nombreux acides aminés. L'ion Na+ est quant à lui solubilisé dans le tampon, et ne reste pas lié.

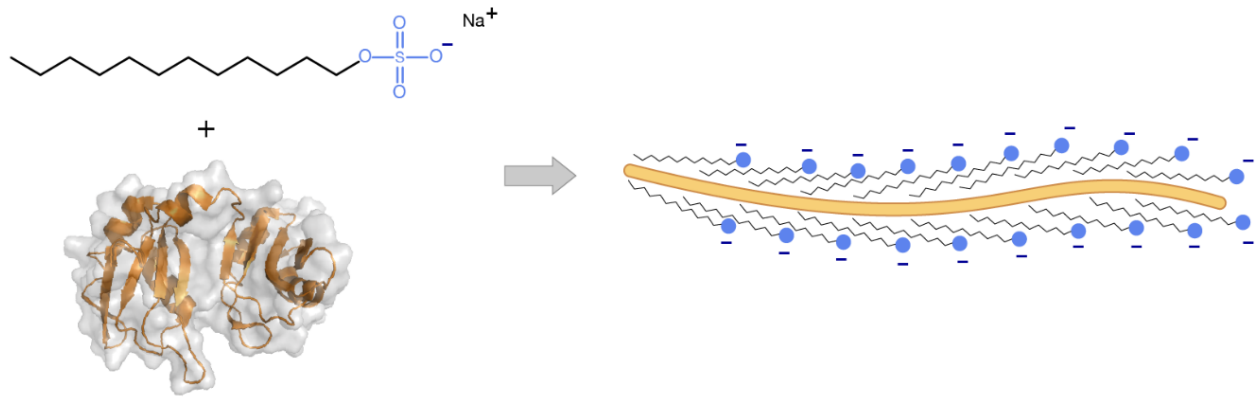
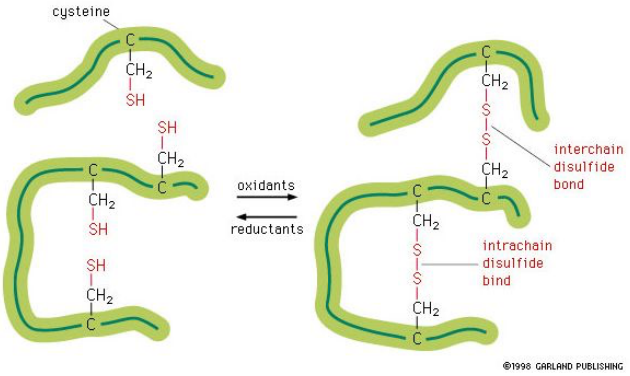


Fig. 1 : Fixation du SDS sur une protéine et linéarisation avec charge négative portée

En présence de SDS, **la seule variable qui différencie les protéines est la masse moléculaire**. La forme n'intervient plus (puisque les protéines sont dénaturées) et la charge native non plus (puisque les charges apportées par le SDS sont largement plus nombreuses). En conséquence, **l'interprétation des résultats obtenus est généralement beaucoup plus simple** que pour une électrophorèse en condition non dénaturante.
Un autre agent chimique couramment utilisé est le β-mercaptoéthanol. C'est un agent réducteur qui a pour propriété de **réduire les ponts disulfures** des protéines, donc de détruire ces pontages covalents qui ne sont pas cassés par le SDS. Cela permet de **séparer les différents polypeptides** reliés par de tels ponts au sein d'une même protéine. La comparaison de SDS-PAGEs avec et sans **β**-mercaptoéthanol d'un même échantillon, complète la compréhension de la structure 3D des protéines.

SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis): denatured gel

Polyacrylamide gel:-SDS: native gel
+SDS:denatured gel
reducing reagent: beta-mercaptoethanol, DTT (dithiothreitol)



SDS-PAGE separates protein samples by the mobility of each macromolecule depending on the linear length of proteins' primary structure and its mass-to-charge ratio.

Fig. 2 : Pont disulfure entre deux cystéines, et son clivage par un agent réducteur (© 1998 Garland Publishing)

En pratique

La protéine d'intérêt, ou les protéines d'intérêt, dont on veut déterminer la structure, sont d'abord purifiées. Ensuite, les protéines sont dénaturées (par exemple avec du SDS), puis on dépose l'échantillon dans un gel de polyacrylamide. On dépose également une solution de protéines connues, achetée dans le commerce, dont on connaît la masse moléculaire.
Les protéines migrent ensuite le long du gel, en fonction de leur masse : les protéines les plus lourdes, plus volumineuses, migrent moins que les protéines les plus légères, qui se déplacent plus facilement au travers du gel.

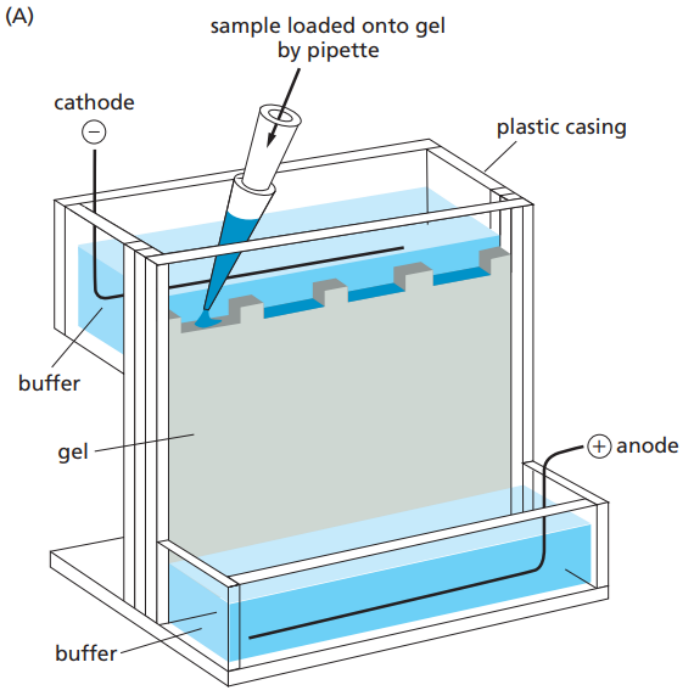


Fig. 3 : Dispositif d'électrophorèse en gel de polyacrylamide

La protéine d'intérêt, purifiée, est déposée dans la figure ci-contre sur la piste 2. Sur la piste 1, on a déposé une solution de protéines de masses connues.

⚠ Point de vigilance : pour chaque « tache bleue », on ne parle pas de « tache », mais de BANDE d'électrophorèse.

La distance de migration d'une protéine est reliée à sa masse moléculaire par une fonction logarithmique. Afin de déterminer la taille de la protéine d'intérêt, on réalise donc un graphique en coordonnées logarithmiques. On positionne en premier lieu tous les points des protéines connues (piste 1 sur l'exemple ci-dessus), et on trace une droite. Après positionnement des coordonnées la protéine d'intérêt, on a alors accès à sa masse moléculaire.

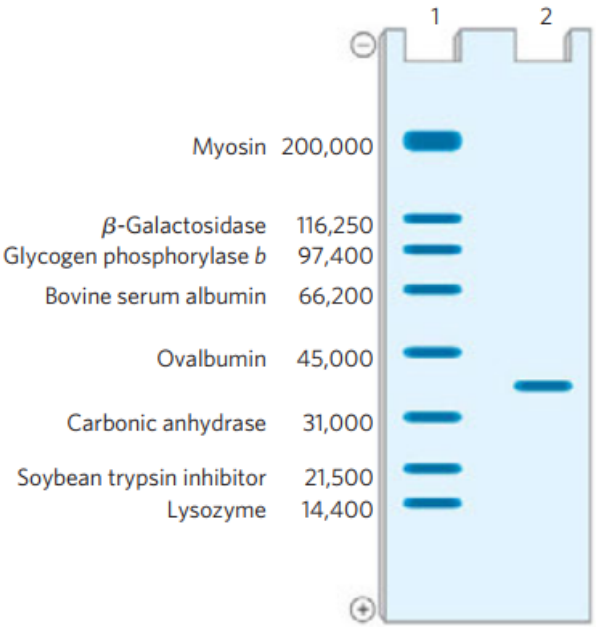


Fig. 4 : Gel SDS-PAGE : piste 1, marqueurs de masse moléculaire connue ; piste 2, protéine d'intérêt purifiée

Exercice : Détermination de la taille d'une protéine

On souhaite déterminer la taille d'une protéine après sa migration sur un gel d'électrophorèse, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).
On utilise des protéines dont on connaît la taille, auxquelles on fait subir une électrophorèse. On note pour chaque protéine sa masse moléculaire, et on mesure sa distance de migration. On obtient le tableau ci-dessous.

Masse moléculaire (kDa)	350	266	200	100	50	33	5
Log_{10}(Masse)							
Distance de migration (cm)	1.2	1.8	2.4	3.8	5.2	6	10

1. Sur le papier millimétré ci-dessous, tracer la courbe étalon donnant la masse moléculaire en fonction de la distance de migration.
2. Déterminer la masse moléculaire du fragment de protéine inconnu, sachant qu'il a migré à 4.1 cm.



Exercice : identification des protéines de la membrane plasmique des hématies

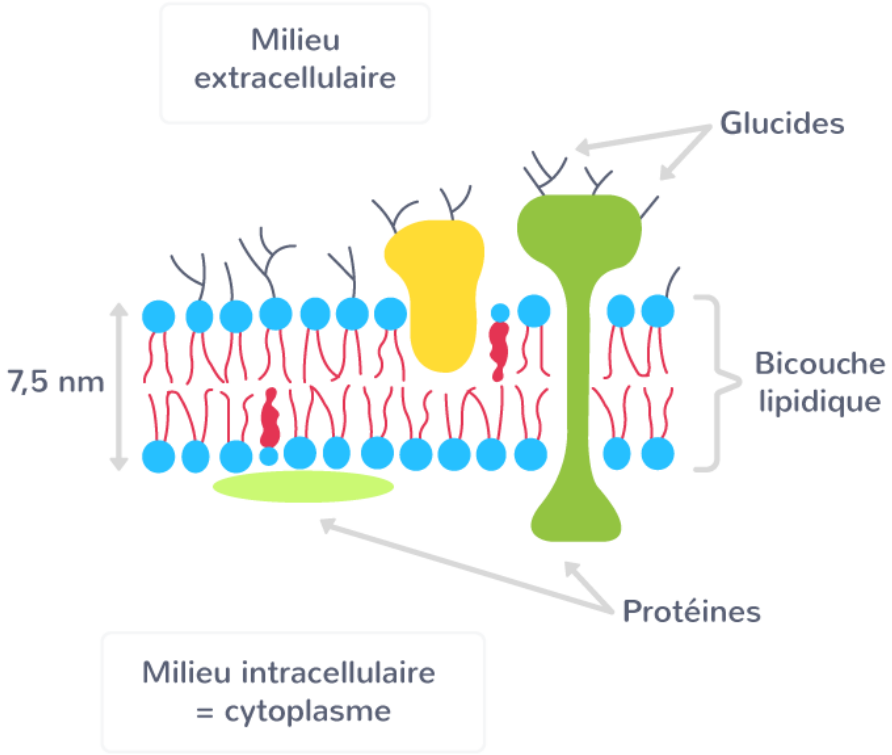


Fig. 5 : Rappel sur l'organisation de la membrane plasmique (enseignement scientifique)

Des globules rouges humains (ou hématies) sont placés dans une solution hypotonique (c'est-à-dire moins concentrée que l'intérieur du globule rouge) : ils gonflent, leur membrane plasmique se rompt et libère le contenu intracellulaire. Les membranes plasmiques (ouvertes) sont récupérées puis lavées de nombreuses fois afin de ne conserver que la membrane et ses constituants.
Les membranes sont remises en suspension dans la dernière solution de lavage, par agitation, puis sont partagées en 2 lots :
- un lot témoin (sans traitement supplémentaire)
- un lot qui subit un traitement salin à forte concentration ionique (on rajoute du NaCl en forte concentration). Le traitement salin modifie les forces ioniques qui lient les protéines périphériques de la membrane à d'autres composants de la membrane plasmique (lipides ou protéines).
Les 2 lots sont ensuite centrifugés afin de faire tomber au fond du tube les structures membranaires : on obtient ainsi un culot, noté C et un surnageant, noté S.
Les culots et les surnageants sont traités avec un détergent appelé SDS. Les protéines récupérées subissent une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Lorsque la migration électrophorétique est suffisante, les gels sont colorés par du bleu de Coomassie (colorant des protéines) ou par du réactif de Schiff (colorant des glucides). Les résultats sont présentés figure ci-dessous.

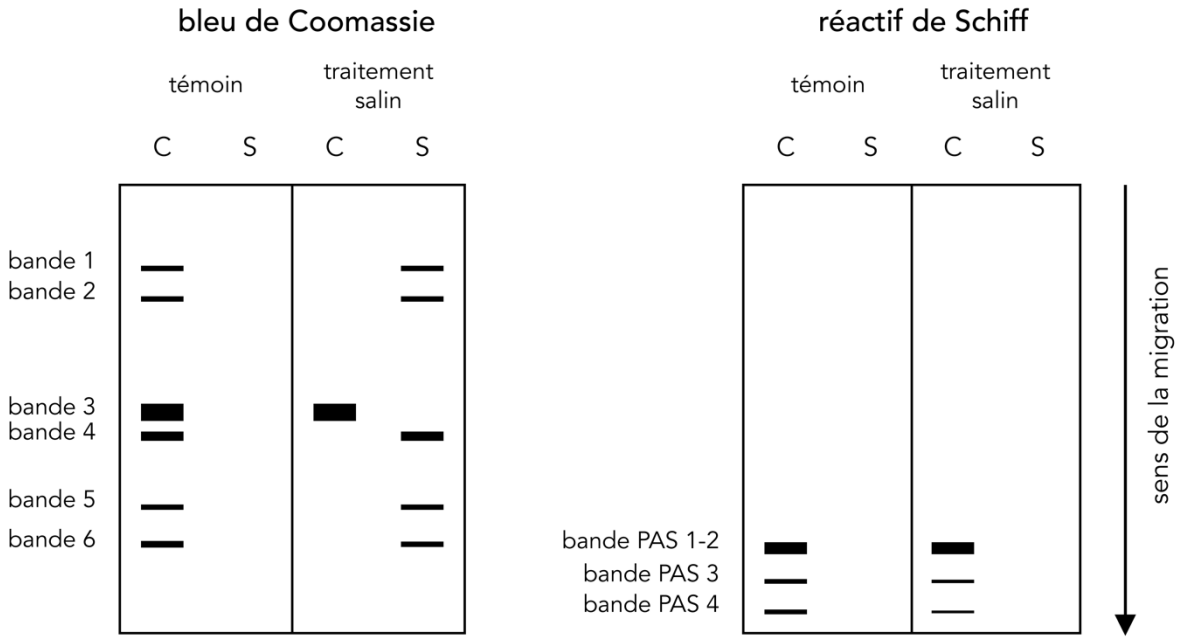


Fig. 6 : SDS-Page des protéines du surnageant et du culot, avec ou sans traitement salin (coloration au bleu de Coomassie et au réactif de Schiff)

Questions :

1. Faire un schéma du protocole et expliquer pourquoi une hématie placée dans une solution hypotonique gonfle jusqu'à explosion.
2. Positionner les pôles + et − et rappeler ce qui permet la migration des molécules.
3. Analyser et interpréter les résultats obtenus après coloration du gel au bleu de Coomassie.
4. Analyser et interpréter les résultats obtenus après coloration du gel au réactif de Schiff.

En mettant les membranes plasmiques dans des conditions de milieu spécifiques, elles se referment : on produit alors des « fantômes » de globule rouge, c'est-à-dire des vésicules limitées par une membrane plasmique.
On produit ainsi 2 types de fantômes, à membrane retournée (à l'envers, c'est-à-dire d'orientation inverse à celle de la membrane plasmique) ou non (à l'endroit). Ces 2 types de fantômes sont traités de la manière suivante :
a. traitement (ou non) par une endoprotéase, enzyme qui coupe les chaînes polypeptidiques en morceaux plus petits, les acides aminés, non révélés par l'électrophorèse. Un lot témoin n'est pas traité par l'endoprotéase.
b. traitement avec du SDS, puis électrophorèse des protéines récupérées sur gel de polyacrylamide.
c. coloration au bleu de Coomassie.
Les résultats obtenus sont les suivants :

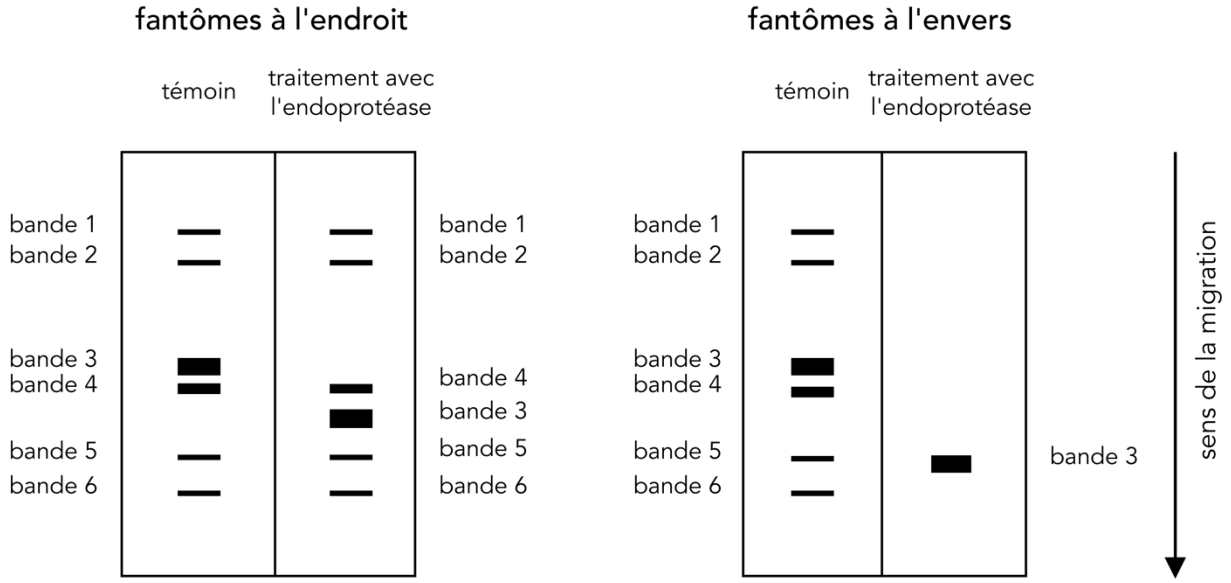


Fig. 7 : Électrophorèse des protéines des fantômes, avec ou sans traitement préalable par une endoprotéase

Questions :
1. À partir de l'analyse précise des résultats d'électrophorèse, indiquer la localisation par rapport à la membrane plasmique (côté externe ou interne) des protéines correspondant aux bandes 1, 2, 4, 5 et 6.
2. Expliquer pourquoi la bande 3 se trouve beaucoup plus bas dans le gel après traitement avec l'endoprotéase.
3. À partir de l'analyse précise des résultats d'électrophorèse, schématiser la localisation et la taille des différentes protéines par rapport à la membrane plasmique.

III – Western blot

Une électrophorèse de protéines en conditions dénaturantes permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Elle permet donc de déterminer la taille d'une protéine préalablement purifiée.
Il peut cependant arriver qu'on n'ait pas pu purifier la protéine… dans ce cas, comment faire pour la repérer et l'étudier, parmi l'ensemble de toutes les protéines cellulaires ?

Étude de cas :
Situation initiale : Je suis en laboratoire, et je souhaite savoir si une personne allergique aux crustacés peut également avoir une réaction en consommant des produits dérivant d'insectes.
PROBLEME :

- La nourriture dérivée de la mouche soldat contient-elle des allergènes ?
- Le sérum de personne allergique aux crevettes réagit-il aux protéines extraites de la nourriture dérivant de la mouche soldat noire ?

Hypothèse : Je fais l'hypothèse que les aliments aux insectes contiennent des molécules allergènes reconnues par le système immunitaire des allergiques au crustacés
Protocole : J'extrait des protéines contenues dans des aliments à la mouche soldat noire (oui ça existe), d'un coté je fais une série de WB ciblant des molécules allergènes connues chez la crevette et d'un autre côté je met ces extraits en présence de sérum de personne allergique aux crustacés et je fais un WB ciblant les anticorps impliqués dans la réaction allergique.
Étape 1 : Extraire toutes les protéines de l'aliment dérivé de la mouche soldat
Étape 2 : Réaliser une électrophorèse de toutes les protéines (SDS-PAGE).
Étape 3 : Transférer les protéines sur une membrane (le plus souvent, en papier buvard en nitrocellulose, d'où le nom de « blot » = buvard en Anglais !) + blocage de la membrane au BSA (on sature la plaque avec de l'albumine sérique bovine pour éviter que les anticorps s'attachent à la plaque)
Étape 4 : Déposer sur la membrane de nitrocellulose les anticorps (Ac, ou « antibodies = Ab » en Anglais) anti-cible allergène, qui se fixeront spécifiquement.
Étape 5 : Laver les excès d'Ac, qui n'ont pas pu se fixer. Seuls les Ac fixés restent.
Étape 6 : Déposer des Ac secondaires, reconnaissant la partie constante des Ac anti-cible, et couplés à une enzyme qui catalyse la formation d'un produit coloré à partir d'un substrat incolore (réaction « chromogénique »)
Étape 7 : Déposer le substrat de l'enzyme, et observer. Les bandes qui deviennent sombres révèlent la présence de :
- Du produit de l'enzyme avec son substrat DONC de l'enzyme
- DONC de l'anticorps secondaire
- DONC de l'anticorps primaire anti-cible
- DONC … de la protéine cible !!

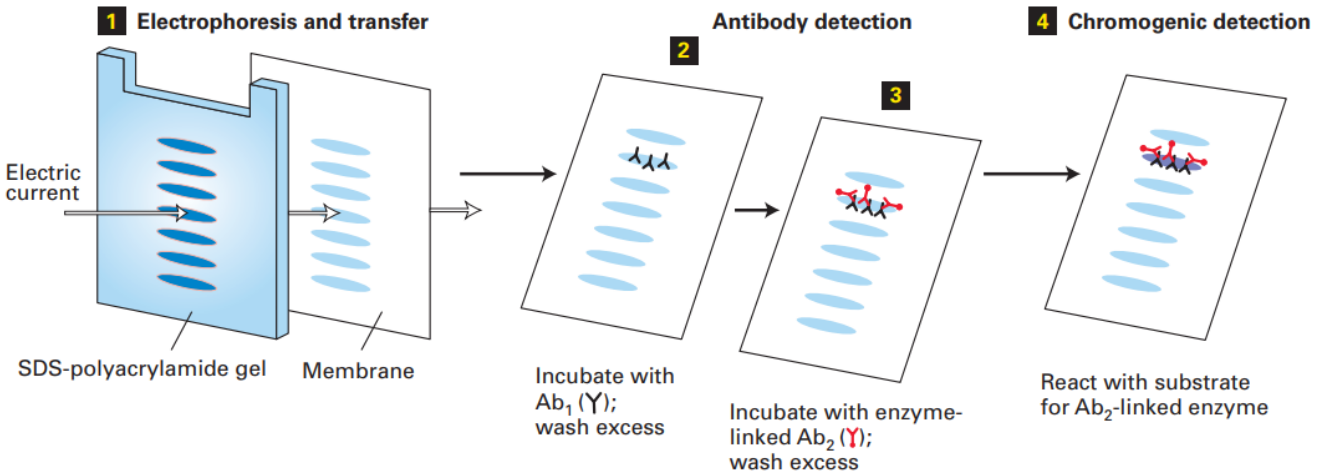


Fig. 8 : Principe général du Western blot : électrophorèse, transfert, détection par anticorps et révélation chromogénique

La technique de Western blot, ou immunodétection, permet donc, sans même connaître la structure d'une protéine, de déterminer si elle est ou non exprimée dans la cellule d'intérêt.

Note : purifier ou produire en quantité une protéine X est, le plus souvent, complexe. Produire un anticorps spécifique d'une protéine X est beaucoup plus facile : il « suffit » d'injecter même une faible quantité de protéine X dans une souris/un lapin/un cochon d'Inde, et d'attendre que l'organisme produise des anticorps. On n'a alors plus qu'à extraire du sérum de l'animal.

De plus, même une petite quantité de protéine d'intérêt suffit à la révéler, puisque la fixation d'un anticorps primaire puis secondaire permet d'amplifier la coloration.

Exercice d'interprétation des résultats d'un Western Blot

Les pistes A, B et C correspondent à des extraits protéiques réalisées sur des produits alimentaires différentes, tous dérivant de la mouche soldat noire.

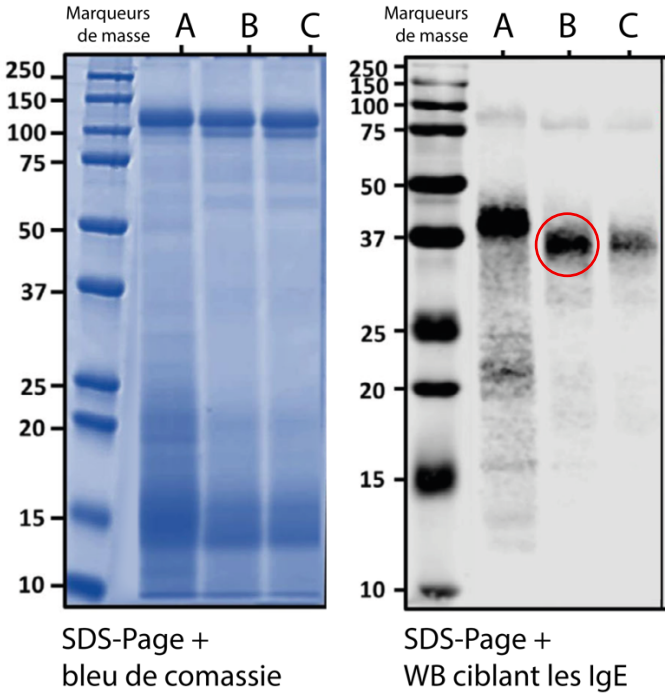


Fig. 9 : SDS-Page et Western Blot anti-IgE

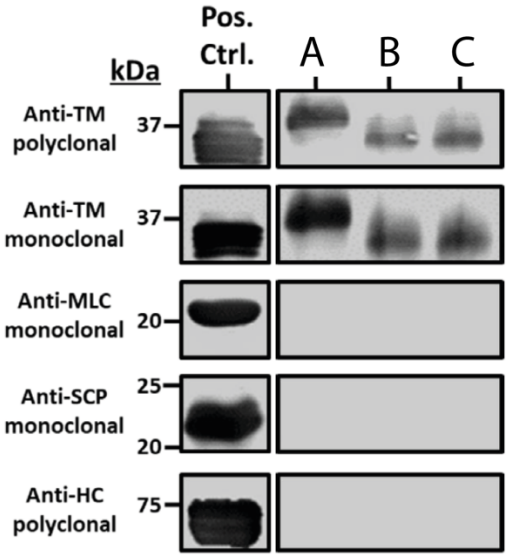


Fig. 10 : Western Blot ciblant différentes protéines allergènes dans les extraits protéiques (TM, MLC, SCP et HC)

Questions :

1. Schématiser le complexe protéique entouré dans la piste B du western blot de la figure 9.
2. Utiliser les résultats ci-dessus pour indiquer si une personne allergique aux crevettes peut réagir à de la nourriture dérivée de mouche soldat noire et quels allergènes semblent impliqués.
3. Quelle expérience complémentaire vous pouvez proposer afin d'affiner la rigueur des conclusions exposées ?

Exercice : Rôle de la protéine p53 dans le devenir des cellules

La protéine p53 joue un rôle important dans le contrôle de la vie de la cellule. Sa synthèse est sous le contrôle de nombreux facteurs externes, et c'est une protéine de signalisation dans de nombreuses voies.

Note : GAPH est une protéine ubiquitaire, exprimée dans toutes les cellules, ayant un rôle central dans le métabolisme.

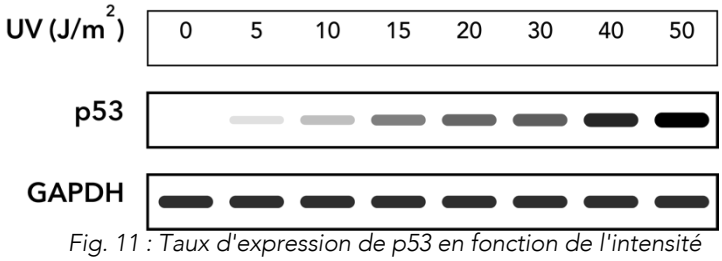


Fig. 11 : Taux d'expression de p53 en fonction de l'intensité d'exposition aux UV d'une culture cellulaire

1. On mesure par Western blot dans le document 1 ci-contre le taux d'expression de p53 chez des cellules soumises à une exposition croissante aux UV.

a. **Indiquer** l'utilité de révéler une bande de GAPDH dans cette manip
b. **Analyser** la variation du taux d'expression de p53 en fonction du taux d'UV reçus par une culture cellulaire.
c. **Formuler une hypothèse** sur les conditions contrôlant l'expression de p53.

Les protéines p21 et p53R2 sont impliquées dans la réparation de l'ADN, tandis que la protéine AIP1 entraîne la mort cellulaire programmée de cellules chez qui elle est exprimée.

2. On stimule artificiellement l'expression de p53 dans une culture cellulaire, et on quantifie par Western blot le taux d'expression de p21, p53R2 et AIP1.

a. À partir des documents ci-contre, **expliquez** comment le taux d'expression de p53 influence le destin des cellules suite à une exposition aux UV.

b. **Vous réaliserez un schéma** montrant le lien entre exposition aux UV, expression de p53, réparation de l'ADN et mort cellulaire.

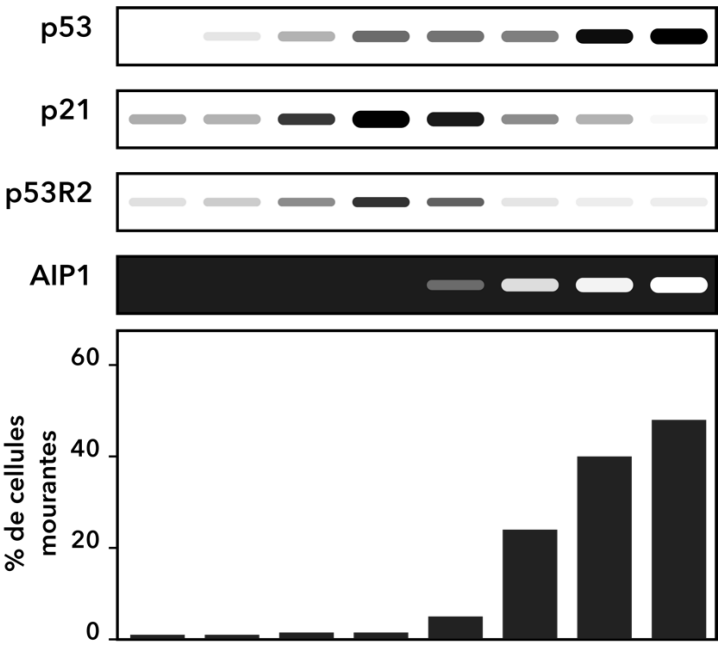


Fig. 12 : Taux d'expression de certaines protéines en fonction de la quantité de protéine p53 dans la cellule

Conclusion

Résumer en 2-3 phrases le principe de chaque technique :

Électrophorèse en conditions natives	
Électrophorèse en conditions dénaturantes (avec SDS seul)	
Électrophorèse en conditions dénaturantes (avec SDS + β-mercaptoéthanol)	
Western blot	